

# 蝴蝶兰的组织培养和快速繁殖

张启香, 方炎明<sup>①</sup>, 张晓平

(南京林业大学森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

**摘要** 通过诱导残败花梗上的休眠芽萌发,以萌发的幼叶和去茎尖的茎段为外植体进行组织培养,建立了蝴蝶兰(*Phalaenopsis amabilis* Bl.)的无菌繁殖体系,并筛选出最佳培养基组成。诱导休眠芽萌发的最佳培养基为不加任何激素的 MS<sub>0</sub>培养基;原球茎诱导的适宜培养基为 MS + 3.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> ZT + 30 mg·L<sup>-1</sup> 柠檬酸和 MS + 5.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 30 mg·L<sup>-1</sup> 柠檬酸 + 30% 椰乳(CM),其中茎段的诱导效果明显优于叶片,诱导率达 95%;诱导无菌苗生根的最适培养基为 1/4 MS + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA,生根率可达 79%。

**关键词:** 蝴蝶兰;组织培养;快速繁殖

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2004)03-0038-03

**Tissue culture and rapid micropropagation of *Phalaenopsis amabilis*** ZHANG Qi-xiang, FANG Yan-ming<sup>①</sup>, ZHANG Xiao-ping (College of Forestry Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2004, 13(3): 38-40

**Abstract:** Flower peduncles of *Phalaenopsis amabilis* Bl. were cultured on MS<sub>0</sub> medium to induce seedlings, then leaflets and shoots without apex of the plantlet were cultured as explants to produce protocorm-like bodies *in vitro*. The suitable media inducing protocorm-like bodies were MS + 3.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> ZT + 30 mg·L<sup>-1</sup> citric acid and MS + 5.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 30 mg·L<sup>-1</sup> citric acid + 30% CM. Induction rate of shoots without apex was higher than that of leaves and it is up to 95%. The optimized medium for rooting was 1/4 MS + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> NAA, the rooting rate reached to 79%.

**Key words:** *Phalaenopsis amabilis* Bl.; tissue culture; rapid micropropagation

蝴蝶兰(*Phalaenopsis* Bl. spp.)是名贵花卉之一,以花大、色艳、花期长而著称,具有很高的观赏价值。蝴蝶兰属单茎性气生兰,极少发育侧枝,难以进行常规的无性繁殖。通过组织培养,可以在短期内获得大量幼小植株,适应市场的大量需求,也是工厂化育苗的重要途径<sup>[1,2]</sup>。关于蝴蝶兰的组织培养曾有许多报道,但大多以未开花的花梗或母株的茎尖为外植体,对母株伤害较大,甚至影响其商品性。本研究以蝴蝶兰(*Phalaenopsis amabilis* Bl.)残败花梗为外植体,在培养基上诱导休眠芽,通过萌发幼苗的不同部位为材料进行诱导、继代、增殖、生根,形成完整植株,为蝴蝶兰的大量繁殖探索有效的途径。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

选取蝴蝶兰(*Phalaenopsis amabilis* Bl.)具休眠芽的花梗做外植体<sup>[3]</sup>。

### 1.2 方法

1.2.1 外植体消毒 将带饱满休眠芽的花梗节切成上下各留 0.5~1.0 cm 的小段,用水冲洗干净,在超净工作台上,先用 70% 的酒精浸泡 20 s(视材料成熟程度可作调整),无菌水冲洗 3~4 次后,再用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 浸泡 6~8 min,无菌水冲洗 3~4 次,去除休眠芽外的苞叶,待接种。

1.2.2 外植体诱导 将带饱满休眠芽的小茎段按照极性接种于 MS<sub>0</sub>(在 MS 培养基中不加任何激素)固体培养基中培养,2 周后,休眠芽萌发。

### 1.3 培养条件

蔗糖浓度:生根培养基 2%,其他培养基 3%;琼脂浓度 6.8%;pH 5.6~5.8;温度(25±1)℃;光源为日光灯,13 h·d<sup>-1</sup>,光照强度 1 500~2 000 lx。

收稿日期: 2003-11-04

作者简介: 张启香(1975-),女,江苏南京人,硕士研究生,主要从事植物发育生物学研究。

<sup>①</sup> 通讯作者

## 2 结果和分析

### 2.1 休眠芽的诱导

接种于培养基中的休眠芽于光照培养下2周萌发,4周左右长出2片叶子。以其上的幼叶和幼茎段作为诱导原球茎的材料。

### 2.2 从无菌幼叶诱导原球茎

在萌发的休眠芽长出1~2片叶后,取其幼嫩叶片,切成5mm×5mm的小块分别接种于培养基中。观察结果表明,基本培养基以高盐培养基MS最为合适,而1/3 MS、VW(Vauin and Went)和花宝1号的培养效果均次之。细胞分裂素选用6-BA和ZT2种

组合,原球茎诱导率在一定范围内随6-BA浓度的上升而增加,但当6-BA的浓度大于3~4 mg·L<sup>-1</sup>时,诱导率反而下降(表1)。柠檬酸对抑制外植体的褐化有明显的效果,而活性炭的效果次之。

### 2.3 从去除茎尖的茎段诱导原球茎

选用高盐MS为基本培养基,添加不同浓度的6-BA,随6-BA浓度的增加,原球茎诱导率有所上升(表2),但6-BA浓度升高,诱导出的原球茎逐渐变得幼嫩、细弱,扩繁效果差,这可能是与6-BA促进细胞分裂分化过快有关。柠檬酸抑制褐化的效果仍优于活性炭。以30%椰乳(CM)作为有机添加物,培养效果较好,因其含多种氨基酸、激素、酶等化合物,对原球茎的诱导有明显的促进作用。

表1 不同培养基对蝴蝶兰叶片原球茎诱导率的影响

Table 1 Effects of different media on protocorm-like body (PLB) formation from *Phalaenopsis amabilis* Bl. leaves

基本培养基 Medium	激素浓度/mg·L <sup>-1</sup> Concentration of phytohormone		柠檬酸 浓度/mg·L <sup>-1</sup> Conc. of citric acid	活性炭 浓度/g·L <sup>-1</sup> Conc. of active carbon	诱导率/% Induction rate	原球茎生长情况 Growth of protocorm-like body (PLB)
	6-BA	ZT				
MS	1.0	0.5	30	0	0	不萌动 Ungrowth
MS	1.0	0.5	0	3	0	失绿、变褐 Lose green and turn brown
MS	1.0	0.5	0	0	0	失绿坏死 Lose green and die
MS	3.0	0.5	30	0	20	生长良好 Grow better
MS	3.0	0.5	0	3	10	少数萌动发育 Several of them develop into PLBs
MS	3.0	0.5	0	0	0	失绿坏死 Lose green and die
MS	5.0	0.5	30	0	5	边缘长出少量原球茎 Several PLBs develop from fringe
MS	5.0	0.5	0	3	0	变褐、坏死 Turn brown and die
MS	5.0	0.5	0	0	0	失绿坏死 Lose green and die
MS	10.0	0.5	30	0	2	萌动很慢 Grow slowly

表2 不同培养基对蝴蝶兰去茎尖茎段原球茎诱导率的影响

Table 2 Effects of different media on protocorm-like body (PLB) formation from *Phalaenopsis amabilis* Bl. shoots without apex

基本培养基 Medium	6-BA 浓度/mg·L <sup>-1</sup> Conc. of 6-BA	柠檬酸 浓度/mg·L <sup>-1</sup> Conc. of citric acid	椰乳浓度/% Conc. of CM	活性炭 浓度/g·L <sup>-1</sup> Conc. of active	诱导率/% Induction rate	原球茎生长情况 Growth of protocorm-like body (PLB)
MS	5.0	30	30	0	95	粗壮,健康 Thick and healthy, grow best
MS	5.0	0	0	2	75	细小、褐化严重、有坏死 Thin, severe browning
MS	10.0	30	30	0	92	较细弱 A little thin
MS	10.0	0	0	2	70	有褐化、坏死现象 Some of them browning and die
MS	20.0	30	30	0	96	细弱、幼嫩 Thin and tender
MS	20.0	0	0	2	78	有褐化现象 Some of them browning
MS	30.0	30	30	0	94	细弱 Thin
MS	30.0	0	0	2	72	褐化 Browning
MS <sup>1)</sup>	2.0	30	30	0	31	较健壮 Thick
MS <sup>1)</sup>	2.0	0	0	2	25	褐化 Browning
MS <sup>2)</sup>	1.0	30	30	0	26	细小 Thin
MS <sup>2)</sup>	1.0	0	0	2	20	褐化 Browning

1) 添加0.1 mg·L<sup>-1</sup>NAA Adding 0.1 mg·L<sup>-1</sup>NAA. 2) 添加3.3 mg·L<sup>-1</sup>GA和1.0 mg·L<sup>-1</sup>IAA Adding 3.3 mg·L<sup>-1</sup>GA and 1.0 mg·L<sup>-1</sup>IAA.

## 2.4 原球茎的增殖和萌发

经幼叶或茎段诱导出来的原球茎早期为一团分生组织细胞,表面形状不规则,继续培养,可见表面光滑圆球形突起。如果不及时对原球茎进行切割或对稍有萌发的原球茎进行去顶后在细胞分裂素浓度较低的培养基中培养,20 d后便会萌发。为了扩大繁殖系数,须将原球茎在未萌发时切开后进行继代培养,但原球茎不宜切得过小,一定密度的原球茎有利于快速繁殖。一般20 d左右须转接1次。这样既可以扩大繁殖系数,也可以有效地抑制培养基褐化。原球茎达到一定数量后,继续培养使其萌发,形成幼

苗,待生根。

## 2.5 壮苗生根培养

选用不同的基本培养基对萌发并具有4~5片叶的小苗进行生根培养,结果表明(表3),低盐培养基1/4 MS较适合生根培养。在培养基3中,生根率为79%,且根长势健壮,数量多;而在培养基4中,生根率仅为31%,且长势较弱。当6-BA与NAA的比值适宜时,根长势较好,如在培养基3中,6-BA与NAA的比值为10,根长势旺盛,健壮。2,4-D对蝴蝶兰生根的效果不明显。土豆汁作为复合添加物对生根较为有利。

表3 不同培养基对蝴蝶兰生根的影响

Table 3 Effects of different media on rooting of *Phalaenopsis amabilis* Bl. plantlets

培养基 编号 No. of medium	基本 培养基 Medium	激素浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Concentration of phytohormone			土豆汁 浓度/% Conc. of potato juice	活性碳 浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Conc. of active carbon	生根率/% Rooting rate	根生长情况 Growth of root
		6-BA	NAA	2,4-D				
1	1/2MS	1.0	0.2	0.00	10	2	52	细长、数量少 Long and less
2	1/2MS	0.5	0.5	0.00	10	2	63	短、根少 Short and less
3	1/4MS	1.0	0.1	0.00	10	2	79	粗壮、根多 Thick and more
4	1/4MS	1.0	0.0	0.01	10	2	31	细弱 A little thin
5	MS	0.1	0.0	0.01	10	2	15	细弱、根少 Thin and less
6	1/2MS	1.0	0.0	0.00	10	2	7	弱、根少 Thin and less

## 3 讨 论

1) 由于蝴蝶兰极少发育侧枝,因而,取茎尖作外植体会破坏母株,取未开放的花茎则将影响其商品价值,所以,以残败花梗上的休眠芽作为外植体,不但不会影响蝴蝶兰的观赏价值和经济价值,而且对植株本身的营养生长也有利。

2) 从诱导结果看,适当浓度的6-BA有助于原球茎的诱导和增殖,浓度过低诱导效果差,浓度过高也会影响原球茎及幼苗的数量和质量<sup>[4,5]</sup>,即苗细弱,较多,这与6-BA促进细胞分裂与分化,细胞分裂过快和打破顶端优势等的作用一致。去茎尖的茎段诱导效果明显优于幼叶,可能是由于前者比幼叶更容易脱分化所致。在盐分较低的1/4 MS中生根培养效果较好,说明较低浓度的盐分有利于侧根发生。

3) 在蝴蝶兰组织培养过程中,伤口极易分泌酚类化合物而造成褐化现象<sup>[6]</sup>,除传统利用活性炭作为吸附剂外,本实验中柠檬酸抑制褐化的效果明显

优于活性炭,这可能是柠檬酸抑制了多酚氧化酶的活性或增强了醌类化合物还原剂的功能。此外,防止褐化还应注意外植体的选取,张秀青等发现外植体切块太小很容易发生褐变<sup>[7]</sup>,本实验中发现,原球茎分割扩繁时,如果切块太小、外植体偏老以及扩繁培养时光照太强,都易褐变死亡。

### 参考文献:

- [1] 谭文澄,戴策刚. 观赏植物组织培养技术[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991.
- [2] 曹孜义,刘国民. 实用植物组织培养技术教程[M]. 甘肃: 甘肃科学技术出版社, 1996.
- [3] Griesbach R J. Development of *Phalaenopsis* orchids for the mass-market[A]. Janick J, Whipkey A. Trends in New Crops and New Uses[M]. Alexandria: ASHS Press, 2002.
- [4] 杨美纯,周歧伟,许鸿源,等. 外部因子对蝴蝶兰叶片原球茎状体发生的影响[J]. 广西植物, 2000, 20(1): 42-46.
- [5] 叶晓青,谢东,魏书,等. 不同激素水平对蝴蝶兰原球茎体增殖的影响[J]. 江苏林业科技, 2000, 27(9): 42-44.
- [6] 姚洪军,罗晓芳,田砚亭. 植物组织培养外植体褐变的研究进展[J]. 北京林业大学学报, 1995, 21(3): 78-81.
- [7] 张秀青,王志武,刘玉敬,等. 蝴蝶兰实生苗不同器官的离体培养[J]. 植物学通报, 1996, 13(1): 50.